

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 井 上 裕 章

主論文 1 編

Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound.

Ultrasonics: Epub ahead of print, 2013 Nov 11

審 査 結 果 の 要 旨

関節リウマチ（rheumatoid arthritis: RA）では腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF）- α を標的とした生物学的製剤が使用されている。しかし、non-responder の存在、多関節に対する効果の不均一性および高額な医療費などの問題があるため、低価格で局所的に TNF- α を制御可能な治療法が切望される。一方、small interfering RNA（siRNA）は配列特異的に遺伝子発現を抑制し、*in vivo* での導入法として超音波を用いたソノポレーション法がある。臨床での超音波使用において有害事象は報告されておらず、ソノポレーション法は siRNA 導入法として安全性が高い。本研究では、TNF- α に対する siRNA（siTNF）をソノポレーション法でラット関節炎モデルの滑膜に導入し、安全性と有効性を検討することを目的とした。

申請者は、動物として 8 週齢の Dark Agouti ラットを用いた。膝関節滑膜から単離培養した滑膜線維芽細胞様細胞に siTNF をリポフェクション法で導入し、TNF- α の遺伝子発現を測定した。超音波の出力、有効照射面積、ビーム不均等率および周波数を解析した。*In vivo* では、超音波照射前後の皮膚温を計測した。ラット膝関節滑膜に蛍光ラベル siRNA をエレクトロポレーション法またはソノポレーション法を用いて導入し、蛍光顕微鏡で観察した。ラット膝関節滑膜に siTNF をソノポレーション法で導入し、TNF- α の遺伝子発現を解析した。ラットに II 型コラーゲン感作させ RA モデルを作製した。膝関節内にソノポレーション法で siTNF を導入し、治療群とした。足部体積と関節腫脹率を計測し、X 線学的および組織学的評価を行った。

In vitro および *in vivo* における siTNF の導入により、TNF- α の遺伝子発現は有意に抑制された。超音波の出力、有効照射面積、ビーム不均等率および周波数はそれぞれ 0.282W, 0.365cm², 3.762 および 3.101MHz であった。ラットの平均皮膚温は超音波照射前 26.8℃で照射後 27.3℃であった。蛍光ラベル siRNA を導入した滑膜において、蛍光色素が観察された。RA モデルにおける足部体積および関節腫脹率は、治療群で有意に低かった。治療群において、X 線学的な関節破壊は軽度であり、組織学的な TNF- α 陽性細胞数は明らかに少なかった。

ソノポレーションを用いたラット滑膜への siRNA 導入が良好であること、安全であることを証明した。治療群における足部体積が有意に低いことから、siTNF をソノポレーション法で導入することにより関節炎の進行が抑制されることを明らかにした。また、X 線学的スコアは治療群で有意に低値であったことから、siTNF が破骨細胞分化を制御することで骨破壊を抑制した可能性がある。さらに、そのメカニズムとして、関節滑膜における TNF- α 蛋白産生が減少したことから、siTNF が TNF- α 遺伝子発現を特異的に制御したと考えた。

以上が本論文の要旨であるが、ソノポレーション法による siTNF の局所導入療法がラット関節炎モデルに対し安全で効果的であることを示した点で、医学的に価値ある研究と認める。

平成 26 年 1 月 16 日

審査委員 教授 池 谷 博 ㊞

審査委員 教授 中 屋 隆 明 ㊞

審査委員 教授 奥 田 司 ㊞